

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 janvier 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/08295 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C08B 37/10, A61K 31/727

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02332

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2001 (18.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/09572 21 juillet 2000 (21.07.2000) FR

(71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR).

(72) Inventeurs : DIAZ, Jacques; 24 bis rue des Parclairs, F-94170 LE PERREUX-SUR-MARNE (FR). PECQUET, Christelle; 18 rue Lavoisier, F-93130 NOISY LE SEC (FR). PERRIN, Elisabeth; 23 rue Poitevin, F-27000 EVREUX (FR). VISKOV, Christian; 3 rue du Béarn, F-91130 RIS ORANGIS (FR).

(74) Mandataire : ROUSSEAU, Pierrick; AVENTIS PHARMA S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 ANTONY CEDEX (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EH, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: HEPARIN-DERIVED POLYSACCHARIDE MIXTURES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns heparin-derived polysaccharide mixtures, their preparation method and pharmaceutical compositions containing them

(57) Abrégé : La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

WO 02/08295 A1

MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR
PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES
CONTENANT

La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine,
5 leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides sulfatés d'origine animale, utilisée
notamment pour ses propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

L'héparine présente cependant des inconvénients qui limitent les conditions de son
utilisation. En particulier, son activité anticoagulante (activité anti-IIa) importante
10 peut occasionner des hémorragies.

Des héparines de bas poids moléculaire obtenues par dépolymérisation basique
d'esters d'héparine ont été proposées (EP40144); cependant ces produits ont encore
une activité anti-IIa importante.

L'invention est relative à des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine
possédant une activité plus sélective vis-à-vis du facteur X activé (facteur Xa) et du
facteur II activé (facteur IIa) que l'héparine.
15

La présente invention a plus particulièrement pour objet les mélanges de
polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides
constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :

20 - ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de
100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-
Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,

- les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs
saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de
25 leurs extrémités,

sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.

Comme sel de métal alcalin ou alcalinoterreux, sont préférés les sels de sodium,
potassium, calcium et magnésium.

Le poids moléculaire moyen est déterminé par chromatographie liquide haute pression en utilisant deux colonnes en série par exemple celles commercialisées sous le nom de TSK G3000 XL et TSK G2000 XL. La détection est réalisée par réfractométrie. L'éluant utilisé est du nitrate de lithium et le débit est de 0,6 ml/min.

- 5 Le système est calibré avec des standards préparés par fractionnement de l'énoxaparine (AVENTIS) par chromatographie sur gel d'agarose-polyacrylamide (IBF). Cette préparation est réalisée selon la technique décrite par Barrowcliffe et coll., *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) ou D.A. Lane et coll., *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78). Les résultats sont calculés à l'aide du logiciel GPC6 (Perkin
10 Elmer).

L'activité anti-Xa est mesurée par la méthode amidolytique sur un substrat chromogénique décrite par Teien et coll., *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), avec comme étalon le premier étalon international des héparines de bas poids moléculaire.

- L'activité anti-IIa est mesurée par la technique décrite par Anderson L.O. et coll.,
15 *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), avec comme étalon le premier étalon international des héparines de bas poids moléculaire.

De préférence, les mélanges tels que décrits plus haut présentent une activité anti Xa comprise entre 125 et 150 UI/mg.

- Tout particulièrement les mélanges tels que décrits plus haut présentent une activité
20 anti Xa comprise entre 140 et 150 UI/mg et ont un poids moléculaire moyen compris entre 2000 et 3000 dalton

De préférence, les mélanges selon l'invention ont une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.

Encore plus préférentiellement, les mélanges présentent un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.

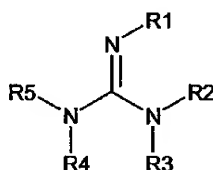
- 25 Les mélanges d'oligosaccharides selon l'invention peuvent être préparés par dépolymérisation d'un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pKa supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponification de l'ester et
30 éventuellement purification.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est de préférence le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium.

- La dépolymérisation s'effectue généralement au sein d'un solvant organique inerte tel qu'un solvant chloré (dichlorométhane par exemple), le tétrahydrofurane, l'anisole, à
5 une température de -20°C à 40°C.

Comme base organique forte de pka supérieur à 20, on peut utiliser le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes.

- 10 Les bases de la famille des guanidines sont de préférence celles de formule :

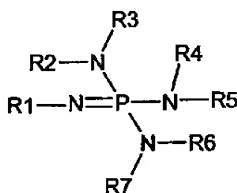


dans laquelle R₁ est hydrogène ou alkyle, R₂, R₃, R₄ et R₅ identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle.

Plus particulièrement, R₁ est hydrogène et R₂, R₃, R₄ et R₅ sont des radicaux méthyle.

- 15 Les bases organiques fortes apparentées à la famille des phosphazènes sont définies par exemple selon R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. 105, 1420 (1993).

Parmi les bases de la famille des phosphazènes on utilise, de préférence, celles de formule :



20

dans laquelle les radicaux R₁ à R₇ sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle.

Dans les formules précédentes, les radicaux alkyle contiennent 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

Avantageusement, le rapport en mole base organique forte de pKa supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5 et, de préférence, entre 1 et 4.

Plus particulièrement, le taux d'estérification du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. Ce taux d'estérification correspond au pourcentage molaire d'estérification des acides uroniques de l'héparine.

La transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée, généralement, par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium et, de préférence, avec une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol (poids/volume), à une température comprise entre 15 et 25°C. L'équivalent en poids d'acétate ajouté est préférentiellement 3 fois supérieur à la masse de sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine engagé dans la réaction de dépolymérisation.

La saponification s'effectue généralement au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin tel que la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 0 et 20°C et, de préférence, entre 0 et 10°C. On utilisera de façon générale de 1 à 5 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin. De préférence, la saponification sera réalisée en présence de 2 à 3 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin.

Le produit final peut éventuellement être purifié par toute méthode connue de purification des héparines dépolymérisées et notamment selon la méthode décrite dans le brevet EP 0037319. De préférence, on purifie au moyen de peroxyde d'hydrogène, en milieu aqueux, à une température de 10 à 50°C. De préférence, cette opération sera réalisée entre 20 et 40°C.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon le schéma réactionnel suivant :

a) transformation de l'héparine sous forme de sel de sodium au moyen du chlorure de benzéthonium pour obtenir l'héparinate de benzéthonium,

b) estérification du sel de benzéthonium obtenu précédemment au moyen du chlorure de benzyle et traitement par une solution alcoolique d'acétate de sodium pour obtenir le sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine,

5 c) transalification du sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine en sel d'ammonium quaternaire et, de préférence en sel de benzéthonium, de cétylpyridinium ou de cétyltriméthylammonium,

La réaction de l'étape a) est réalisée en milieu aqueux, par action du chlorure de benzéthonium en excès, sur l'héparine sous forme de sel de sodium, à une température voisine de 15 à 25°C. De manière avantageuse, le rapport molaire chlorure de
10 benzéthonium/héparine sous forme de sel de sodium est compris entre 2 et 3 et plus particulièrement 2,5.

L'héparine sous forme de sel de sodium de départ utilisée est de préférence une héparine de porc. Celle-ci peut être préalablement purifiée pour diminuer son taux de dermatane sulfate selon le procédé décrit dans le brevet FR2663639.

15 L'estérification de l'étape b) s'effectue de préférence au sein d'un solvant organique chloré (chloroforme, chlorure de méthylène par exemple), à une température comprise entre 25 et 45°C et, de préférence entre 30 et 40°C. L'ester sous forme de sel de sodium est ensuite récupéré par précipitation au moyen d'acétate de sodium à 10% en poids/volume dans un alcool tel que le méthanol. On emploie généralement 1 à 1,2
20 volume d'alcool par volume de milieu réactionnel. La quantité de chlorure de benzyle et le temps de réaction sont adaptés pour obtenir un taux d'estérification compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. De façon préférentielle, on utilise 0,5 à 1,5 partie en poids du chlorure de benzyle pour 1 partie en poids du sel de benzéthonium de l'héparine. De même, de façon préférentielle, le temps de réaction
25 sera compris entre 10 et 35 heures.

La transalification de l'étape c) s'effectue au moyen d'un chlorure d'ammonium quaternaire et, de préférence, au moyen de chlorure de benzéthonium, de chlorure de cétylpyridinium ou de chlorure de cétyltriméthylammonium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 10 et 25°C. De manière avantageuse, le rapport en mole
30 chlorure d'ammonium quaternaire/sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 2 et 3.

Les mélanges selon l'invention sous forme de sel de sodium, peuvent être transformés en un autre sel d'un métal alcalin ou alcalinoterreux. On passe éventuellement d'un sel à l'autre en utilisant la méthode décrite dans le brevet US4168377.

5 Les mélanges selon l'invention ne sont pas toxiques et peuvent ainsi être utilisés comme médicaments.

10 Les mélanges de la présente invention peuvent être utilisés comme agents antithrombotiques. En particulier, ils sont utiles pour la prévention des thromboses veineuses, des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas d'infarctus du myocarde. Ils sont également utiles dans la prévention et le traitement de la prolifération des cellules musculaires lisses, l'angiogénèse, et comme agent neuroprotecteurs de l'athérosclérose et de l'artériosclérose.

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif un mélange de polysaccharides selon l'invention éventuellement en association avec un ou plusieurs excipients inertes.

15 Les compositions pharmaceutiques sont par exemple des solutions injectables par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Elles sont également utiles par voie pulmonaire (inhalation).

20 La posologie peut varier en fonction de l'âge, du poids et de l'état de santé du patient. Pour un adulte, elle est en général comprise entre 20 et 100 mg par jour par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE A : PREPARATION DU SEL DE BENZETHONIUM DE L'ESTER BENZYLIQUE DE L'HEPARINE

Heparinate de benzéthonium

25 A une solution de 10 g d'héparine sous forme de sel de sodium dans 100 ml d'eau à une température voisine de 20°C, on ajoute une solution de 25 g de chlorure de benzéthonium dans 125 ml d'eau. Le produit est filtré, lavé à l'eau et séché.

Ester benzylique d'héparine (sel de sodium)

A une solution de 20 g d'héparinate de benzéthonium dans 80 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 16 ml de chlorure de benzyle. La solution est chauffée à une température de 30°C pendant 12 heures. On ajoute alors 108 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient
5 ainsi 7,6 g d'ester benzylique d'héparine sous forme de sel de sodium dont le taux d'estérification est de 77%.

Ester benzylique d'héparine (sel de benzéthonium)

Dans un erlenmeyer A de 2 litres, on introduit 36 g (0,0549 mole) d'ester benzylique d'héparine (sel de sodium) et 540 ml d'eau distillée. Après homogénéisation à une
10 température d'environ 20°C, on obtient une solution jaune pâle. Sous agitation magnétique, on prépare dans un erlenmeyer B de 1 litre, une solution de 64,45 g (0,1438 mole) de chlorure de benzéthonium et de 450 ml d'eau. La solution de l'erlenmeyer B est coulée en environ 35 minutes dans la solution de l'erlenmeyer A sous agitation. On observe la formation d'un précipité blanc abondant. L'erlenmeyer B
15 est rincé avec 200 ml d'eau distillée et l'eau de lavage est introduite dans l'erlenmeyer A. L'agitation est alors arrêtée et on laisse déposer la suspension pendant 12 heures. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée. Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 560 ml d'eau et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité en 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté
20 (560 ml). Sur le précipité sédimenté, on renouvelle deux fois cette opération de lavage par environ 560 ml d'eau distillée. Dans la dernière opération de lavage, on laisse le précipité en suspension et on filtre sur Verre Fritté 3. Le gâteau est ensuite lavé par 4 fois 200 ml d'eau distillée. Le solide blanc humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on
25 obtient 87,5 g d'ester benzylique d'héparine, sel de benzéthonium. Le rendement obtenu est de 94,9%.

EXEMPLE 1

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous
30 agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,32 g (0,00948 mole) de 1,5,7-

triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution

5 méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (62 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant

10 est prélevé et écarté (49 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau jaune d'or obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,21 g d'héparine

15 dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 1,21 g (0,0018 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) obtenue précédemment et 11 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 0,18 ml (0,0018 mole) de lessive de

20 soude à 30%. Après addition, le mélange est refroidi à 4°C et agité pendant 2 heures. On ajoute 1,43 g de NaCl et on neutralise la solution par ajout d'HCl à 1mole/l (14 ml). Le mélange est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml et 52 ml de méthanol sont ajoutés. On observe la formation d'un précipité jaune. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de

25 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (44 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (21 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre

30 Fritté 3. Le gâteau jaune clair obtenu est ensuite lavé par 2 fois 10 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 60%.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 10 ml, on introduit 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 5,9 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 0,1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10 et on ajoute 33 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, on ajoute 0,65 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 0,1mole/l. La solution est ensuite filtrée et transvasée dans un erlenmeyer de 25 ml. On coule 23,3 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 5 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,51 g d'un mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

Les caractéristiques de ce mélange sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 1600 daltons

Activité anti-Xa : 94 UI/mg

Activité anti-IIa : < 0,1 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : > 100

EXEMPLE 2**Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :**

Dans un erlenmeyer A de 100 ml, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,00595 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans

- l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,7 ml (0,00587 mole) de 2-tert-butylimino-2-diethylamino-1,3-diméthyl-perhydro-1,3,2-diazaphosphorine. A une température voisine de 20°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B,
- 5 une solution de 30 g d'acétate de sodium dans 300 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (204 ml). Sur le
- 10 précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 125 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (162 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 125 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité gélatineux en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau gélatineux jaune obtenu est ensuite lavé par
- 15 2 portions de 63 ml de méthanol. Le solide gélatineux est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 3,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 85,3%.

Saponification :

- 20 On saponifie 1,67 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,94 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61%.

Purification :

- 25 On purifie 0,94 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,71 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 75,5%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 30 Poids moléculaire moyen : 2500 Daltons

Activité anti-Xa : 146,6 UI/mg

Activité anti-IIa : 2,15 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 68

EXEMPLE 3

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- 5 Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu selon l'exemple A. Après dissolution complète et refroidissement à 2°C, on ajoute 0,333 g (0,00239 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. A une température voisine de 20°C, on laisse la
- 10 réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la
- 15 suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (90 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (61 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité
- 20 en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le solide est jaune intense. Le rendement obtenu est de 75,9%.

25 Saponification :

On saponifie 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,78 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 71,5%.

Purification :

On purifie 0,78 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,58 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 72,5%.

- 5 Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2700 Daltons

Activité anti-Xa : 100,1 UI/mg

Activité anti-IIa : 3,3 UI/mg

- 10 Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 27,3

EXEMPLE 4

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique de l'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète et à 2°C, on ajoute 0,6 ml (0,00222 mole) de 2-tert-butylimino-tris(diméthylamino)phosphorane. A une température voisine de 0°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (108 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaunâtre), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (60 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité blanc jaunâtre en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le

solide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,8 %.

Saponification :

- 5 On saponifie 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,69 g d'une poudre jaune très clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61,6%.

Purification :

- 10 On purifie 0,69 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,67 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 97,1%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 15 Poids moléculaire moyen : 2900 Daltons

Activité anti-Xa : 145,2 UI/mg

Activité anti-IIa : 4,5 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 32,6

EXEMPLE 5

- 20 Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- 25 Dans un ballon A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'héparinate de benzyle (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium). Après dissolution complète et à 40°C, on ajoute 0,95 g (0,00949 mole) d'imidazolate de sodium. Au reflux du dichlorométhane, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 4 heures. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est

coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant orange est prélevée et écartée (88 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie orange), on ajoute
5 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (51 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité orange en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide est essoré puis séché sous
10 pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 76,6%.

Saponification :

On saponifie 1,2 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium)
15 précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,63 g d'une poudre beige. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 52,5%.

Purification :

On purifie 0,63 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment
20 obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,42 g d'une poudre blanc beige. Le rendement est de 66,7%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2250 Daltons

25 Activité anti-Xa : 134,5 UI/mg

Activité anti-IIa : 1,5 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 90,5

EXEMPLE 6

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,33 g (0,00956 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5ène. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (56 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 60 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (70 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau jaune d'or obtenu est ensuite lavé par 2 fois 50 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,92 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 64 %.

Saponification :

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 0,92 g (0,0014 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) obtenue précédemment et 17,5 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 0,38 ml (0,00379 mole) de lessive de soude à 30%. Après addition, le mélange est maintenu à une température voisine de 20°C et agité pendant 5 heures. On ajoute 1,8 g de NaCl et on neutralise la solution par ajout d'HCl à concentré (volume final de la solution environ 18 ml). Le mélange est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml et 46 ml de méthanol sont ajoutés. On observe la formation d'un précipité jaune. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (52 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On

laisse re-sédimenter le précipité 1 heure environ. Le surnageant est prélevé et écarté (27 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 1 heure environ. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 10 ml de méthanol. Le solide humide est
5 essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 3 heures de séchage, on obtient 0,42 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 45,6 %.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 10 ml, on introduit 0,42 g d'héparine dépolymérisée brute
10 obtenue précédemment et 3,8 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 38°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 0,1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10 et on ajoute 25 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures 30 minutes d'agitation, on ajoute 0,5 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 0,1 mole/l. La solution est ensuite
15 filtrée et transvasée dans un erlenmeyer de 25 ml. On coule 11,3 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (9,8 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. On laisse re-
20 sédimenter le précipité 3 heures environ. Le surnageant est prélevé et écarté (6,2 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 5 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après
25 environ 2 heures 20 minutes de séchage, on obtient 0,39 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 92,8%.

Les caractéristiques de l'héparine dépolymérisée ainsi obtenue sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 1950 daltons

Activité anti-Xa : 115,6 UI/mg

30 Activité anti-IIa : < 2 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : > 57

EXEMPLE 7

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un réacteur A de 400 ml, on introduit 140 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 20 g (0,0119 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A.

5 Après dissolution complète, on mesure la teneur en eau du milieu réactionnel par la méthode de Karl Fisher. La valeur obtenue est de 0,1% d'eau. On ajoute alors 3,5 ml (0,0121 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthyl-perhydro-1,3,2-diazaphosphorine. A une température voisine de 25°C, on laisse la réaction se

10 poursuivre pendant environ 24 heures. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium dans 300 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, la moitié du mélange réactionnel du réacteur A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est maintenue pendant une heure et on laisse

15 décanter la suspension pendant environ 12 heures à 4°C. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (220 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 220 ml de méthanol et on agite pendant 50 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 40 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (204 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 204 ml de méthanol et on agite

20 pendant 40 minutes. Le précipité gélatineux en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau gélatineux jaune obtenu est ensuite lavé par 2 portions de 100 ml de méthanol. Le solide gélatineux est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après environ 12 heures de séchage, on obtient 2,6 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le

25 rendement obtenu est de 70,6 % (calculé sur la base de la moitié du milieu réactionnel traité).

Saponification :

On saponifie 2,6 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1.

30 obtient 1,48 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 62,9%.

Purification :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 1,48 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 15 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10. La solution est filtrée sur une membrane filtrante de porosité 1 µm. On ajoute ensuite

5 76 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, on ajoute 1,5 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 1mole/l. La solution est filtrée sur une membrane filtrante de porosité 1 µm. On coule 38 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension

10 pendant 1 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (37 ml). Sur le précipité, on ajoute 37 ml de méthanol et on agite pendant 45 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 45 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (34 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 34 ml de méthanol et on agite pendant 15 minutes. Le précipité en suspension est ensuite

15 filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,29 g d'héparine dépolymérisée pure (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 87,2%.

L'héparine dépolymérisée purifiée (sel de sodium) obtenue présente les

20 caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2250 Daltons

Activité anti-Xa : 149 ,6 UI/mg

Activité anti-IIa : 0,85 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 176

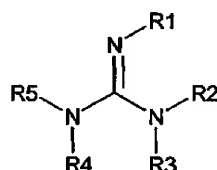
REVENDEICATIONS

- 1 - Mélanges de polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :
- ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de 100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,
 - les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de leurs extrémités,
- 10 sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.
- 2- Mélanges selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'activité anti Xa est comprise entre 125 et 150 UI/mg
- 3- Mélanges selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'activité anti Xa est comprise entre 140 et 150 UI/mg et le poids moléculaire moyen est compris entre 2000 et 3000 dalton
- 15 4 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 sous forme de sel de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium.
- 5 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ayant une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.
- 20 6 - Mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 présentant un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.
- 25 7 - Procédé de préparation des mélanges de la revendication 1 caractérisé en ce que l'on dépolymérise un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pka supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transforme le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponifie l'ester et éventuellement purifie le produit.

8 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium.

9 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel la base organique forte de pka
5 supérieur à 20 est choisie parmi le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes,

10 - Procédé selon la revendication 9 pour lequel les bases de la famille des guanidines sont celles de formule :

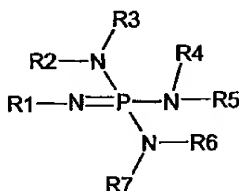


10

dans laquelle R₁ est hydrogène ou alkyle, R₂, R₃, R₄ et R₅ identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle, les radicaux alkyle ayant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

11 - Procédé selon la revendication 10 pour lequel R₁ est hydrogène et R₂, R₃, R₄ et
15 R₅ sont des radicaux méthyle.

12 - Procédé selon la revendication 9 pour lequel les bases de la famille des phosphazènes sont celles de formule :



20

dans laquelle les radicaux R₁ à R₇ sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, en chaîne droite ou ramifiée.

13 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 12 pour lequel le rapport en mole base organique forte de pka supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5.

- 14 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 13 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine a un taux d'estérification compris entre 50 et 100%.
- 5 15 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 14 pour lequel la transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium.
- 16 - Procédé selon l'une des revendications 7 à 15 pour lequel la saponification s'effectue au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin.
- 10 17 - Procédé selon l'une des revendication 7 à 16 pour lequel la purification s'effectue au moyen de peroxyde d'hydrogène.
- 18 – Mélanges tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 à titre de médicaments .
- 15 19 – Mélanges tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 à titre de médicaments antithrombotiques
- 20 - Compositions pharmaceutiques comprenant en tant que principe actif un mélange selon l'une des revendications 1 à 6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08B37/10 A61K31/727

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 027 089 A (CHOAY S.A.) 15 April 1981 (1981-04-15) abstract page 1, line 9 - line 20 page 2, line 14 - page 3, line 10 page 3, line 25 - line 32 page 4, line 23 - page 5, line 18 page 9, line 8 - line 10 page 10 page 11, line 21 - line 29 page 22, line 15 - line 20 claims 1-10</p> <p style="text-align: center;">— — — — — — / —</p>	1, 4-6, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2001

Date of mailing of the international search report

06/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02332

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 040 144 A (PHARMINDUSTRIE) 18 November 1981 (1981-11-18) cited in the application abstract page 4, line 20 - line 34 page 5; table A page 7, line 20 - line 28 page 8, line 10 - line 24 page 11, line 10 - line 14 examples 7,8 table 8 claims 1,5	1,4,7,8, 13-16,20
A	----- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; VILA PAHI, F. JAVIER ET AL: "Preparation of saccharide oligomers by chemical depolymerization of heparin derivatives" retrieved from STN Database accession no. 125:303695 CA XP002165129 abstract & ES 2 077 533 A (BIOIBERICA, S.A., SPAIN) 16 November 1995 (1995-11-16)	
A	----- WO 81 02737 A (CHOAY S.A.) 1 October 1981 (1981-10-01) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02332

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 27089	A	15-04-1981	AT 17586 T	15-02-1986
			AU 543679 B2	26-04-1985
			AU 6392080 A	28-04-1981
			CA 1194441 A1	01-10-1985
			DE 3071370 D1	06-03-1986
			DK 247981 A	04-06-1981
			EP 0027089 A1	15-04-1981
			WO 8101004 A1	16-04-1981
			IE 51166 B1	29-10-1986
			IL 61201 A	30-09-1984
			JP 2031721 B	16-07-1990
			JP 56501320 T	17-09-1981
			US 4401758 A	30-08-1983
			US 4401662 A	30-08-1983
			US 4474770 A	02-10-1984
			US RE35770 E	14-04-1998
			US 4826827 A	02-05-1989
			ES 495658 D0	01-10-1981
			ES 8107245 A1	16-12-1981
EP 40144	A	18-11-1981	FR 2482611 A1	20-11-1981
			AR 229510 A1	15-09-1983
			AT 384428 B	10-11-1987
			AT 213681 A	15-04-1987
			AU 535791 B2	05-04-1984
			AU 7051981 A	19-11-1981
			CA 1181744 A1	29-01-1985
			DE 3165361 D1	13-09-1984
			DK 211981 A	15-11-1981
			EP 0040144 A1	18-11-1981
			ES 502199 D0	16-08-1982
			ES 8206555 A1	16-11-1982
			FI 811469 A ,B,	15-11-1981
			GR 82283 A1	13-12-1984
			HU 34769 A2	28-04-1985
			IE 51283 B1	26-11-1986
			IL 62866 A	29-06-1984
			IN 152828 A1	14-04-1984
			JP 1324284 C	27-06-1986
			JP 57010601 A	20-01-1982
			JP 60051482 B	14-11-1985
			KR 8401753 B1	19-10-1984
			MX 6537 E	04-07-1985
			NO 811632 A ,B,	16-11-1981
			NZ 197081 A	31-07-1984
			PT 73024 A ,B	01-06-1981
			ZA 8103176 A	26-05-1982
ES 2077533	A	16-11-1995	ES 2077533 A1	16-11-1995
WO 8102737	A	01-10-1981	FR 2478646 A2	25-09-1981
			AR 227417 A1	29-10-1982
			AT 26450 T	15-04-1987
			AU 540433 B2	15-11-1984
			AU 6787081 A	09-10-1981
			BA 97179 B1	28-12-1998
			CA 1207759 A1	15-07-1986
			CS 222245 B2	27-05-1983

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02332

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8102737 A		DD 157561 A5	17-11-1982
		DE 3176086 D1	14-05-1987
		DK 511381 A	18-11-1981
		EP 0037319 A1	07-10-1981
		ES 501130 D0	16-01-1982
		ES 8201596 A1	16-03-1982
		WO 8102737 A1	01-10-1981
		HR 970502 B1	30-04-1998
		HU 188657 B	28-05-1986
		IE 52951 B1	27-04-1988
		IL 62424 A	31-12-1984
		JP 2031081 B	11-07-1990
		JP 57500335 T	25-02-1982
		PL 230237 A1	13-11-1981
		SI 8110736 A8	30-06-1997
		SU 1658820 A3	23-06-1991
		US 4500519 A	19-02-1985
		US 4686288 A	11-08-1987
		YU 73681 A1	31-10-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/02332

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C08B37/10 A61K31/727

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>EP 0 027 089 A (CHOAY S.A.) 15 avril 1981 (1981-04-15) abrégé page 1, ligne 9 - ligne 20 page 2, ligne 14 -page 3, ligne 10 page 3, ligne 25 - ligne 32 page 4, ligne 23 -page 5, ligne 18 page 9, ligne 8 - ligne 10 page 10 page 11, ligne 21 - ligne 29 page 22, ligne 15 - ligne 20 revendications 1-10</p> <p style="text-align: center;">— — — — — — / —</p>	1, 4-6, 20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 novembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/12/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 040 144 A (PHARMINDUSTRIE) 18 novembre 1981 (1981-11-18) cité dans la demande abrégé page 4, ligne 20 - ligne 34 page 5; tableau A page 7, ligne 20 - ligne 28 page 8, ligne 10 - ligne 24 page 11, ligne 10 - ligne 14 exemples 7,8 tableau 8 revendications 1,5	1,4,7,8, 13-16,20
A	DATABASE CHEMABS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; VILA PAHI, F. JAVIER ET AL: "Preparation of saccharide oligomers by chemical depolymerization of heparin derivatives" retrieved from STN Database accession no. 125:303695 CA XP002165129 abrégé & ES 2 077 533 A (BIOIBERICA, S.A., SPAIN) 16 novembre 1995 (1995-11-16)	
A	WO 81 02737 A (CHOAY S.A.) 1 octobre 1981 (1981-10-01)	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/02332

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 27089	A	15-04-1981	AT 17586 T	15-02-1986
			AU 543679 B2	26-04-1985
			AU 6392080 A	28-04-1981
			CA 1194441 A1	01-10-1985
			DE 3071370 D1	06-03-1986
			DK 247981 A	04-06-1981
			EP 0027089 A1	15-04-1981
			WO 8101004 A1	16-04-1981
			IE 51166 B1	29-10-1986
			IL 61201 A	30-09-1984
			JP 2031721 B	16-07-1990
			JP 56501320 T	17-09-1981
			US 4401758 A	30-08-1983
			US 4401662 A	30-08-1983
			US 4474770 A	02-10-1984
			US RE35770 E	14-04-1998
			US 4826827 A	02-05-1989
			ES 495658 D0	01-10-1981
			ES 8107245 A1	16-12-1981
EP 40144	A	18-11-1981	FR 2482611 A1	20-11-1981
			AR 229510 A1	15-09-1983
			AT 384428 B	10-11-1987
			AT 213681 A	15-04-1987
			AU 535791 B2	05-04-1984
			AU 7051981 A	19-11-1981
			CA 1181744 A1	29-01-1985
			DE 3165361 D1	13-09-1984
			DK 211981 A	15-11-1981
			EP 0040144 A1	18-11-1981
			ES 502199 D0	16-08-1982
			ES 8206555 A1	16-11-1982
			FI 811469 A ,B,	15-11-1981
			GR 82283 A1	13-12-1984
			HU 34769 A2	28-04-1985
			IE 51283 B1	26-11-1986
			IL 62866 A	29-06-1984
			IN 152828 A1	14-04-1984
			JP 1324284 C	27-06-1986
			JP 57010601 A	20-01-1982
			JP 60051482 B	14-11-1985
			KR 8401753 B1	19-10-1984
			MX 6537 E	04-07-1985
			NO 811632 A ,B,	16-11-1981
			NZ 197081 A	31-07-1984
			PT 73024 A ,B	01-06-1981
			ZA 8103176 A	26-05-1982
ES 2077533	A	16-11-1995	ES 2077533 A1	16-11-1995
WO 8102737	A	01-10-1981	FR 2478646 A2	25-09-1981
			AR 227417 A1	29-10-1982
			AT 26450 T	15-04-1987
			AU 540433 B2	15-11-1984
			AU 6787081 A	09-10-1981
			BA 97179 B1	28-12-1998
			CA 1207759 A1	15-07-1986
			CS 222245 B2	27-05-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/02332

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8102737 A		DD 157561 A5	17-11-1982
		DE 3176086 D1	14-05-1987
		DK 511381 A	18-11-1981
		EP 0037319 A1	07-10-1981
		ES 501130 D0	16-01-1982
		ES 8201596 A1	16-03-1982
		WO 8102737 A1	01-10-1981
		HR 970502 B1	30-04-1998
		HU 188657 B	28-05-1986
		IE 52951 B1	27-04-1988
		IL 62424 A	31-12-1984
		JP 2031081 B	11-07-1990
		JP 57500335 T	25-02-1982
		PL 230237 A1	13-11-1981
		SI 8110736 A8	30-06-1997
		SU 1658820 A3	23-06-1991
		US 4500519 A	19-02-1985
		US 4686288 A	11-08-1987
		YU 73681 A1	31-10-1983